第35卷 第1期 昆 虫 学 报 Vol. 35, No. 1
1992年2月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Feb., 1992

副肌球蛋白在意大利蜜蜂间接飞翔肌中的定位

周念辉 王宝华 陈 明
(中国科学院上海生理研究所,上海 200031)

肌肉收缩是由于肌原纤维中粗、细肌丝相互滑行的结果(Huxley, 1988; Huxley, 1983; Squire, 1986)。许多无脊椎动物肌肉粗肌丝中除含有肌球蛋白外,还存在着含量不同的副肌球蛋白(陈明等,1984、1985)。我们曾经进行过一系列关于意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica* Spin)间接飞翔肌原纤维排列及其粗肌丝亚丝结构的研究。间接飞翔肌的粗肌丝从Z-线延伸至另一Z-线(范世藩等,1966),分离的天然粗肌丝经变性剂(脲、胍)处理,可以散开成直径约为5nm的数根亚丝,在一些亚丝上有周期为40nm的小桥突起(陈明等,1965; Maw 和 Rowe, 1980; Pepe, 1982)。我们曾从蜜蜂飞翔肌肌原纤维中制备了副肌球蛋白类晶体(陈明等,1982)。利用选择性抽提、蛋白质分级分离和电子显微镜法鉴定,观察到肌原纤维A带包含有肌球蛋白和副肌球蛋白(陈明等,1982); 蜜蜂间接飞翔肌粗肌丝是由副肌球蛋白内芯和六根肌球蛋白亚丝形成的外套装配而成(范世藩等,1986; Chen 等,1990;Beinbrech 等;1988)。本文报道利用免疫细胞化学和免疫电镜方法,进一步研究副肌球蛋白在意蜂间接飞翔肌中的定位,现将结果报道如下。

材料和方法

1 材料 本工作以意大利蜜蜂间接飞翔肌为实验材料。

2 方法

肌原纤维和天然粗肌丝的制备方法见陈明等(1985);意蜂副肌球蛋白的制备方法见陈明等(1982)。

意蜂副肌球蛋白抗体的制备 副肌球蛋白类晶体(约0.5mg)溶于0.5ml含600m mol/L KCl、10m mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.0)的溶液中,加入等体积的 Freunds 完全佐剂,充分混匀乳化,在雄兔(2.5kg)颈部、背部多点皮下注射,重复注射3次,间隔10天。最后经颈动脉放血,制备抗血清。抗血清以肌球蛋白、原肌球蛋白吸附,再经硫酸铵分级沉淀,制得免疫球蛋白。以 Ouchterlong 免疫双扩散法检验抗体特异性。

荧光抗体间接染色法和辣根过氧化物酶间接免疫酶标法 基本上按 Levine 等(1972)方法进行。借光学显微镜观察。

免疫反应及电子显微镜观察 将粗肌丝悬浮液滴加于喷有碳膜的标本栅上,经抗副肌球蛋白 IgG 以及羊抗兔疫 γ-球蛋白处理,然后经1%醋酸铀染色1分钟,用日立 H-500 电子显微镜观察。

结果与讨论

意蜂飞翔肌副肌球蛋白经3次重结晶纯化。图版1的4、5图是用来产生抗体的意蜂飞翔肌副肌球蛋白的电子显微镜照片,呈针状(图版 I:4),在高倍放大时可以见到特征性72.5nm周期(图版 I:5)。

我们使用荧光抗体间接染色法和辣根过氧化物酶间接免疫酶标法观察了副肌球蛋白在肌原纤维中的定位。图版2显示免疫化学定位结果。图版 I:1 是未经处理的意蜂间接飞翔肌肌原纤维的相差显微

本文于1989年12月收到。

镜照片，图中 A、I、Z 分别表示肌小节中的A带、I 带和 Z-线、肌小节长约 2.5μm，A 带较宽，I 带狭窄。图版 I:2 是经过荧光抗体标记的同一根肌原纤维，抗体附着在A 带中央部分和整个 I 带显示荧光，在相当于 Z-线位置可以看见一条不显荧光的暗线。图版 I:3 是经辣根过氧化物酶间接免疫酶标法处理后得到的结果，其着色部分和荧光抗体结合的部位相同。Bullard (1983) 曾用副肌球蛋白抗体标记负子蝽 (*Lethocerus maximus*) 飞翔肌的肌原纤维，得到的结果和我们得到的相同。

图版 I:6 是分离的天然粗肌丝，长约 2.4μm。图版 I:7 是经抗副肌球蛋白抗体处理的意蜂间接飞翔肌粗肌丝，自肌丝表面向外伸出的横桥清晰可见，间隔约为 40nm，这与脊椎动物横纹肌粗肌丝的形态是相似的。经过抗体处理，在粗肌丝的中央和两端有 3 个显著的黑色斑点，这说明副肌球蛋白结合于这些部位。可以认为，肌球蛋白分子呈反向平行排列 (Davis, 1988)。装配成意蜂间接飞翔肌粗肌丝的外套，而副肌球蛋白构成其内芯，这样副肌球蛋白在粗肌丝中央及两端有所裸露，而能与抗副肌球蛋白抗体相结合。

参 考 文 献

陈明等 1965 从蜜蜂横纹肌肌原纤维蛋白细丝分离微丝的观察。生物化学与生物物理学报 5(6): 673—4。
陈明等 1982 蜜蜂间接飞翔肌肌原纤维副肌球蛋白的鉴定。生物化学与生物物理学报 14(1): 94—6。
陈明等 1982 蜜蜂飞翔肌收缩蛋白的电子显微镜鉴定。昆虫学报 25(4): 465—8。
陈明等 1984 带口蛎平滑闭壳肌收缩装置的超微结构。生物化学与生物物理学报 16(6): 577—80。
陈明等 1985 鳌虾腹屈肌的肌球蛋白——副肌球蛋白丝。生理学报 37(4): 383—7。
范世藩等 1966 蜜蜂飞翔肌肌原纤维粗蛋白细丝的电子显微镜观察。科学通报 17(5): 219—22。
范世藩等 1986 蜜蜂间接飞翔肌粗肌丝的微丝结构。昆虫学报 29(2): 139—42。

Beinbrech, G., F. T. Ashton, & F. A. Pepe 1988 Invertebrate myosin filament: Subfilament arrangement in the wall of tubular filaments of insect flight muscles. *J. Mol. Biol.* 201(3): 557—65.

Bullard, B. 1983 Contractile proteins of insect flight muscle. *TIBS* 8(2): 68—70.

Chen Ming, Zhou Nianhui & Fan Shihfang 1990 Organization of myosin/paramyosin myofilament of indirect flight muscle of honey bee. The Fifth Chinese-Japanese Electron Microscopy Seminar.

Davis, J. S. 1988 Assembly processes in vertebrate skeletal thick filament formation. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17: 217—39.

Huxley, A. F. 1988 Muscle contraction. *Ann. Rev. Physiol.* 50: 1—16.

Huxley, H. E. 1983 Molecular basis of contraction in cross-striated muscles and relevance to motile mechanism in other cells. in Stracher, A. (ed.) Muscle and Nonmuscle Motility. Vol. 1, pp 1—104. Academic Press, New York,

Levine, R. J. C., M. M. Dewey, & G. W. de Villafranca, 1972 Immunohistochemical localization of contractile proteins in *Limulus* striated muscle. *J. Cell Biol.* 55(1): 221—35.

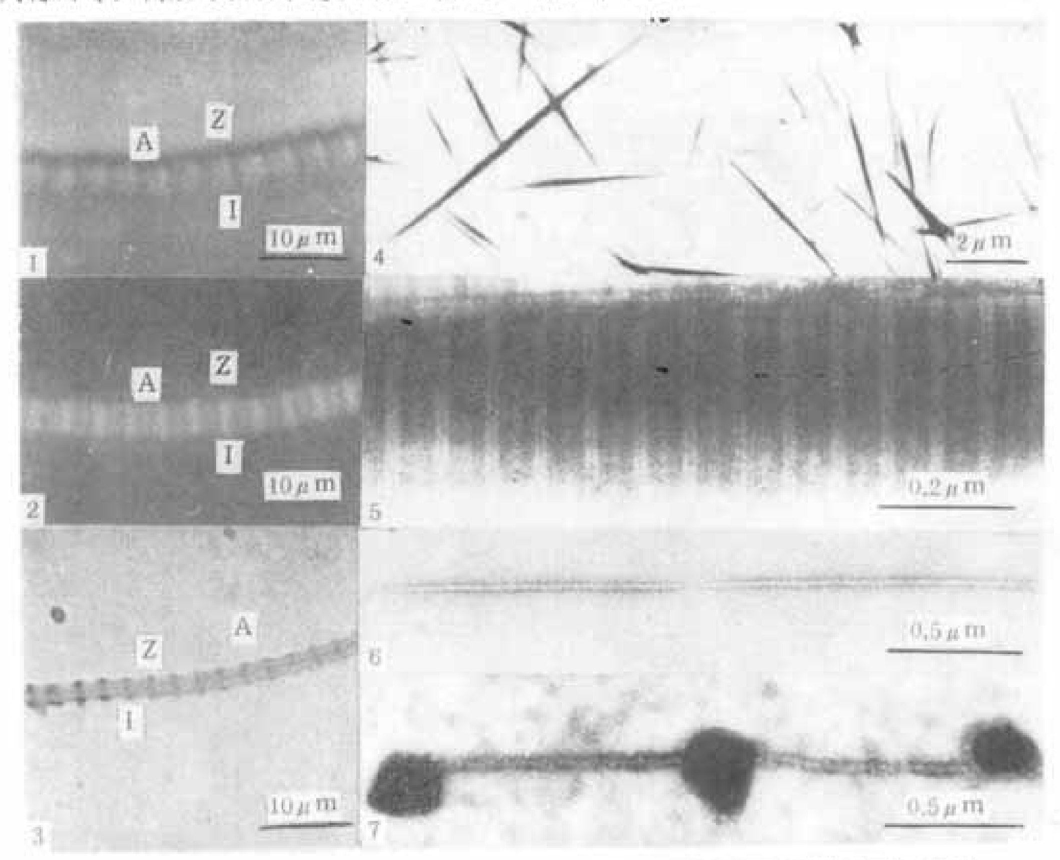
Maw, M. C. & A. J. Rowe, 1980 Fraying of A-filaments into three subfilaments. *Nature* 286(5771): 412—4.

Pepe, F. A. 1982 The structure of vertebrate skeletal muscle myosin filaments. in Dowben, R. M. & Shay, J. W. (ed.) Cell and Muscle Motility. Vol. II, pp 141—71. Plenum Press, New York and London.

Squire, J. M. 1986 Muscle myosin filaments: internal structure and crossbridge organization. *Comments Mol. Cell. Biophys.* 3(3): 155—77.

IMMUNOLOGICAL LOCALIZATION OF PARAMYOSIN IN INDIRECT FLIGHT MUSCLE OF *APIS MELLIFERA LIGUSTICA* SPIN

Zhou Nian-hui Wang Bao-hua Chen Ming
(*Shanghai Institute of Physiology, Academia Sinica Shanghai* 200031)



1. 未经处理的肌原纤维相差显微镜照片。2. 经间接荧光抗体标记后的肌原纤维荧光显微镜照片，示副肌球蛋白抗体结合于A带中央及两侧的I带。3. 经辣根过氧化物酶间接免疫酶染色后的肌原纤维光学显微镜照片。4. 副肌球蛋白类晶体呈针状的电子显微镜照片。5. 示副肌球蛋白类晶体 72.5nm 周期(局部)。6. 分离出的蜜蜂间接飞翔肌天然粗肌丝。7. 粗肌丝经抗副肌球蛋白抗体处理，显示抗体结合于粗肌丝中央及两端。

A: 示A带　I: 示I带　Z: 示Z线